

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY DOCUMENT
 SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
 COMPLIANCE WITH
 RULE 17.1(a) OR (b)



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
 einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:	102 48 751.0
Anmeldetag:	18. Oktober 2002
Anmelder/Inhaber:	Professor Dr. med. Wolfgang E. Berdel, Dr. med. Carsten Müller-Tidow, Priv.-Doz. Dr. med. Hubert Serve und Björn Steffen, Münster, Westf/DE.
Bezeichnung:	Dyslokalisationsmoleküle und deren Verwendung
IPC:	C 07 K 14/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 16. Oktober 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

UEXKÜLL & STOLBERG
PATENTANWÄLTE

BESELERSTRASSE 4
D - 22607 HAMBURG

Dr.med. Prof. Wolfgang E. Berdel
Brüggelweg 11
48161 Münster

Dr. med. Carsten Müller-Tidow
Lortzingstr. 9
48145 Münster

PD Dr. med. Hubert Serve
Ochtrupweg 42
48161 Münster

Björn Steffen
Bentelerstr. 39
48149 Münster

DR. J.-D. FRHR. von UEXKÜLL (- 1992)
DR. ULRICH GRAF STOLBERG (- 1998)

EUROPEAN PATENT ATTORNEYS
EUROPEAN TRADEMARK ATTORNEYS
DIPL.-ING. JÜRGEN SUCHANTKE
DIPL.-ING. ARNULF HUBER
DR. ALLARD von KAMEKE
DIPL.-BIOL. INGEBORIG VOELKER
DR. PETER FRANCK
DR. GEORG BOTH
DR. ULRICH-MARIA GROSS
DR. HELMUT van HEESCH
DR. JOHANNES AHME
DR. HEINZ-PETER MUTH
DR. MARTIN WEBER-QUITZAU
DR. BERND JANSEN
DR. ALBRECHT von MENGES
DR. MARTIN NOHLEN
MÜNCHEN
DIPL.-ING. LARS MANKE
RECHTSANWALT IN HAMBURG
DR. FRANK DETTMANN

Oktobér 2002
me/gu/P 57744

Dyslokalisationsmoleküle und deren Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dyslokalisationsmoleküle, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung von Tumoren.

Die Lokalisation eines Proteins, also der Aufenthaltsort in einer Zelle, in einem Gewebe oder im Plasma hat wesentlichen Einfluss auf die Funktion und Aktivität des Proteins. Dies gilt in besonderem Maße für Proteine, die an der Zellregulation beteiligt sind.

Eukaryonten-Zellen enthalten intrazelluläre Membranen, die nahezu die Hälfte des Zellinhaltes in räumlich getrennte, als Organellen bezeichnete Kompartimente aufteilen. Die Haupttypen der in allen eukaryontischen Zellen vorkommenden membranumschlossenen Organellen sind das Endoplasmatische Reticulum, der Golgi-Apparat, der Zellkern, die Mitochondrien, die Lysosomen, die Endosomen und die Peroxisomen. Jedes Organell besitzt einen bestimmten Satz an Proteinen, der die Aufrechterhaltung der organellspezifischen Funktionen gewährleistet.

Die neu synthetisierten Proteine finden ihren Weg vom Cytosol, wo sie gebildet werden, zu dem Organell, in dem sie spezifische Aufgaben erfüllen, indem sie einem spezifischen Transportweg folgen. Der Transportweg ist durch Signale in Form von Signalpeptiden oder Signalbereichen in der Aminosäure-Sequenz des Proteins festgelegt. Diese Signalpeptide werden von entsprechenden Rezeptoren des Zielorganells erkannt. Proteine, die ihre Aufgabe im Cytosol erfüllen, enthalten keine Signalpeptide und verbleiben daher im Cytosol (Alberts et al., Molekularbiologie der Zelle; VCH Verlag, 3. Auflage).

Die zielgerichtete Lokalisation der Proteine wird ferner durch deren Organisation als multimere Komplexe erzielt, welche gezielt zu subzellulären Strukturen transportiert werden können. Diese Komplexe werden an entsprechenden Orten durch ihre Affinität gegenüber Anker- oder Scaffold-Proteinen und mittels anderer struktureller Komponenten an diesem Ort gehalten. Die Affinität einzelner Proteine zu diesen Strukturen hängt von entsprechenden Lokalisationsdomänen, post-translationalen Modifikationen, allosterischen Veränderungen und anderen Effekten ab (Stein et al., J.Cell.Biochem., Suppl.(2000), S.84-92).

Die Funktion verschiedener Proteinfamilien, die DNA-bindende und transaktivierende Aktivität aufweisen, wie beispielsweise Catenin, Notch oder STAT-Proteine, hängt essentiell von dem Transport aus dem Cytosol in den Zellkern ab.

In vielen Erkrankungen ergeben sich funktionale Konsequenzen einer Mutation durch veränderte Lokalisation der mutierten Genprodukte. Bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) beispielsweise hängt das transformierende Potential des Bcr-Abl nicht nur von der aktivierte Kinaseaktivität des Abl ab, sondern auch von der gestörten, Aktin-gebundenen Lokalisation des Proteins. Aufgrund dieser Lokalisation werden sowohl mitogene als auch antiapoptotische Signallewege aktiviert, wodurch die transformierende Aktivität erreicht

wird (Daley et al., Science, Vol.247 (1990), S.824-830).

Ein nukleärer Einschluß des Bcr-Abl durch unspezifische Hemmung der nukleären Exportmaschinerie führt beispielsweise zur Apoptose der Bcr-Abl positiven Zellen (Vigneri P. & Wang J.Y., Nat.med., Vol.7 (2001), S.228-234).

Bei der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) ist die maligne Transformation oft mit einer Proteindyslokalisation verbunden. Die häufigsten chromosomal Translokationen erzeugen chimäre Proteine, die Transkriptionsfaktoren umfassen, wodurch häufig die DNA-Bindungsdomäne eines Transkriptionsaktivators mit einem Transkriptionsrepressor fusioniert wird. Es erfolgt somit ein Fehltransport des Transkriptionsrepressors zu den Zielgenen des Transkriptionsaktivators.

Die häufigste chromosomale Translokation bei der AML ist die t(8;21) Translokation, die in 10-15% der erwachsenen Patienten mit dieser Krankheit gefunden wird (Downing J.R., Br.J. Haematol. Vol. 106 (1999), S.296-308). Aufgrund dieser Translokation wird das C-terminale Ende des Transkriptionsaktivators AML1 durch den Transkriptionsrepressor ETO ersetzt und erzeugt das Fusionsprotein AML1-ETO (Meyers et al., Mol.Cell.Biol., Vol.15 (1995), S.1974-1982; und Lenny et al., Oncogene, Vol.11 (1995), 1761-1769).

Das Fusionsprotein AML1-ETO ist in der Lage, die Bindung verschiedener Co-Repressoren und Histon-Deacetylasen (HDACs) zu bewirken, und auf diese Weise die Expression der AML1 Zielgene, beispielsweise von GM-CSF, der neutrophilen Elastase und c/EBP α , zu inhibieren (Britos-Bray, M. & Friedman, A.D., Mol.Cell.Biol., Vol.17 (1997), S.5127-5135); Frank et al., Oncogene, Vol.11 (1995), S.2667-2674); Pabst, et al., Nat.Med., Vol.7 (2001), S.444-451; und Oelgeschlager et al., Mol.Cell.Biol., Vol.16 (1996), S.4717-25). Es ist davon auszugehen, daß diese Wirkung des AML1-ETO für die für AML typische Blockade der Differenzierung verantwortlich ist.

Hämatologische Tumorerkrankungen, wie beispielsweise AML, werden heute üblicherweise durch die Applikation von Chemotherapeutika behandelt. Die beschränkte Verfügbarkeit von Wirkstoffen, die spezifisch auf Krebszellen gerichtet sind und diese angreifen, ist ein wesentlicher Grund für die schlechte Prognose bei vielen Krebsarten.

Für den Patienten ist die Therapie in jedem Fall mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden, da die Wirkung des jeweiligen Therapieansatzes alle proliferierenden Zellen trifft. Die Nebenwirkungen können bis hin zu akuten Nierenversagen und toxisch bedingten Organschädigungen an Herz, Lunge, Leber und Nervensystem führen. Als Folge der immunsuppressiven Wirkung dieser Therapie muß mit einer gehäuften Anzahl von tödlich verlaufenden Infektionen gerechnet werden.

Im Stand der Technik wurde daher versucht, Tumorzell-spezifische Therapieansätze zu entwickeln. So wurde ein defizientes Adenovirus konstruiert, das ausschließlich in Tumoren mit Mutationen im p53 Signaltransduktionsweg replizieren kann (Bischoff et al., 1996, Science, Vol.274, S.373-6). Durch dieses Vorgehen werden Tumorzellen, welche eine p53 Mutation aufweisen, infiziert, während andere Zellen nicht beeinflußt werden. Der praktische Wert dieser Therapie wird gegenwärtig in klinischen Versuchen untersucht (McCormick F., 2000, Semin.Cancer Biol., Vol.10, S.453-9).

Die meisten Therapieansätze sind jedoch auf die Identifizierung kleiner Moleküle gerichtet, die als Inhibitoren onkogener Proteine verwendet werden könnten, beispielsweise spezifische Inhibitoren der Tyrosinkinasen. ST1571, ein Inhibitor verschiedener Tyrosinkinasen, darunter Bcr-Abl, hat sich gegen t(9;22) Leukämien als wirksam erwiesen (Vigneri et al., 2001, Nat.Med., Vol.7, S.228-34). Trotz der Wirksamkeit des ST1571 bei der Hemmung der molekularen Ziele in BCR-ABL-assoziierten Erkrankungen wird volle Wirksamkeit nur bei CML-Patienten mit einer frühen (chronischen Phase), aber

nicht voll ausgebildeten Erkrankung erreicht. Im Gegensatz dazu ist ein Rückfall bei den meisten Patienten mit Bcr-Abl positiver Akuter Lymphoblastischer Leukämie und CML-Blastenkrise zu beobachten. Der Grund besteht wahrscheinlich darin, daß der Krebs das Ergebnis einer Serie genetischer Veränderungen ist und die Umkehr eines dieser onkogenen Ereignisse durch einen Wirkstoff für die Heilung der Erkrankung nicht ausreichend ist.

Obwohl molekulare Angriffsziele (sogenannte "targets") für eine Krebstherapie mit zunehmender Geschwindigkeit identifiziert werden, sind bislang kaum Ideen entwickelt worden, wie dieses Wissen für spezifische Therapien genutzt werden könnte.

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die als aktiver Wirkstoff eines Arzneimittels eine verbesserte Behandlung von Tumoren, insbesondere von Leukämien ermöglichen.

Diese Aufgabe wurde nunmehr durch Verbindungen gelöst, die Bindungsaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweisen und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken können.

Im Gegensatz zu den Therapieansätzen aus dem Stand der Technik richtet sich der Therapieansatz der vorliegenden Erfindung somit auf eine Dyslokalisation eines onkogenen Moleküls, bei dem die Funktion des Onkogens nicht inhibiert, sondern zur Eliminierung der Onkogen-enthaltenden Zellen genutzt wird. Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind hoch spezifisch und haben keinerlei Wirkung auf Zellen, die das Tumor-spezifische Molekül nicht aufweisen.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der Verbindung um ein Peptid, Oligopeptid, Protein oder Fusionsprotein. Es ist aber ebenfalls möglich, kleine Moleküle einzusetzen, die durch ihre spezifische Bindung an das Tumor-

spezifische Molekül charakterisiert sind. Eine Vielzahl organischer Moleküle ist hierbei einsetzbar. Als organische Moleküle werden vorliegend Kohlenwasserstoffe von geringem Molekulargewicht verstanden. Diese können ein Molekulargewicht von <5000 Da, vorzugsweise <1000 Da und besonders bevorzugt <500 Da aufweisen. Ebenso ist es denkbar, zusammengefügte Moleküle zu verwenden, die aus zwei unterschiedlichen Komponenten bestehen.

Das Tumor-spezifische Molekül ist ein Molekül, das in dieser Form entweder ausschließlich in Tumorzellen vorliegt oder in Tumorzellen in einer anderen Konzentration als in gesunden Zellen vorliegt. Vorzugsweise handelt es sich auch bei dem Tumor-spezifischen Molekül um ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, RNA oder DNA. Hierbei sind auch tumorspezifische posttranskriptionale Modifikationen wie Phosphorylierung, Glykosylierung, Acetylierung, Methylierung und ähnliche Modifikationen als Tumor-spezifische Parameter möglich.

Gemäß einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei dem Tumor-spezifischen Molekül um ein Fusionsprotein, welches ausschließlich in Tumorzellen vorliegt, beispielsweise das Molekül AML1-ETO. Weiter angreifbare Tumor-spezifische Moleküle sind die aus anderen chromosomal Translokationen entstehenden Fusionsproteine bei Leukämien (Bcr-Abl, PML-RARalpha, PLZF-RARalpha, MLL-Fusionsproteine, etc.) sowie bei anderen malignen Erkrankungen (z.b. EWS-Fli bei Sarkomen).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen eine Bindungsaffinität für die Tumor-spezifischen Moleküle auf. Die Bindungsaffinität liegt vorzugsweise im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-12} , und besonders bevorzugt im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-9} .

Die erfindungsgemäßen Verbindungen sind in der Lage, eine Dyslokalisation der Tumor-spezifischen Moleküle zu bewirken. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Dyslokalisation eines

Tumor-spezifischen Moleküls der Transport des Moleküls innerhalb der Zelle oder des Gewebes an einen Ort verstanden, an dem dieses Molekül in Tumorzellen üblicherweise nicht vorliegt. Beispielsweise kann eine Dyslokation eine Bindung Tumor-spezifischer Proteine (beispielsweise Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren) an die genomische DNA an Positionen bewirken, an denen die Tumor-spezifischen Proteine sonst nicht binden würden.

Gemäß eines anderen Beispiels kann die Dyslokation eines Tumor-spezifischen Moleküls zur Folge haben, daß dieses sezerniert oder in ein Zellorganell transportiert wird, obwohl es in der Tumorzelle ein cytoplasmatisches Molekül ist. Das Tumor-spezifische Molekül kann beispielsweise aus dem Nukleus exportiert werden, obwohl es in Tumorzellen ein nukleäres Molekül ist.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung führt die Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls zu einer mehr als 60%igen Inhibition des Wachstums der Tumorzellen, wobei eine mehr als 80%ige Inhibition besonders bevorzugt ist. Die Wachstumsinhibition kann über eine Verringerung der Kolonien-Bildung in Methylzellulose nach dem Verfahren von Mizuki, M. et al. "Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways", Blood, 2000 Dec 1, Vol. 96(12), 3907-14, bestimmt werden.

Gemäß einer alternativen Ausführungsform führt die Dyslokation zu einer Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. Die Apoptose in den Tumorzellen ist dabei in Zellen, welche mit dem erfindungsgemäßen Molekül behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Zellen vorzugsweise um den Faktor 2 erhöht, wobei eine Steigerung der Apoptose um mindestens den Faktor 3 besonders bevorzugt ist. Die gesteigerte Induktion der Apoptose in den Tumorzellen kann mittels Standardassays gemessen werden (Darzynkiewicz, Z. et al., "Flow cytometry in analysis of cell

cycle and apoptosis", Semin Hematol. 2001 Apr, Vol.38(2), 179-93).

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann die Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls beispielsweise zur Bindung des Tumor-spezifischen Moleküls an eine Nukleinsäuresequenz führen, welche die Transkription eines Gens reguliert. Durch die Bindung des Tumor-spezifischen Moleküls kann die Transkription des Gens aktiviert oder inhibiert werden.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt die Verbindung die Peptidsequenz der c-myb DNA-Bindungsdomäne und/oder die Peptidsequenz der AML1-Bindungsdomäne des MEF ("myeloid elf like factor"). Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Verbindung die in SEQ ID NO:1 gezeigte Aminosäuresequenz auf.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, die für ein erfindungsgemäßes Peptid oder Protein kodieren, das Bindungssaffinität für ein Tumor-spezifisches Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann. Bei der Nukleinsäure handelt es sich vorzugsweise um DNA oder RNA. Die Nukleinsäure kann Teil eines Vektors sein, der für eine Expression der Nukleinsäure ausgelegt sein kann. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Verbindung von der in SEQ ID NO:2 gezeigten Nukleotidsequenz kodiert.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Wirts-Zellen, die eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aufweisen.

Die Erfindung umfasst ferner Arzneimittel, welche eine erfindungsgemäße Verbindung, Nukleinsäure oder Wirts-Zellen umfassen. Das Arzneimittel kann ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfassen und zur oralen, intravenösen oder intramuskulären

Verabreichung formuliert sein.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung, Nukleinsäuren oder Wirts-Zellen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren, Leukämien, insbesondere der Akuten Myeloischen Leukämie. Die Behandlung einer Akuten Myeloischen Leukämie, die durch eine t(8;21) Translokation verursacht wurde, ist besonders bevorzugt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind ferner Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen umfaßt. Soweit es sich dabei um ein Peptid oder Protein handelt, kann dieses rekombinant exprimiert oder durch Proteinsynthese gewonnen werden.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, bei denen man:

- (a) ein Tumor-spezifisches Molekül identifiziert; und
- (b) eine Verbindung identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.

Tumorspezifische Moleküle werden bei diesem Verfahren mittels moderner Genomik- und Proteomik-Verfahren identifiziert. Hierbei können zum Beispiel Microarray-Analysen oder 2D-Proteingelektrophoresen mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung sowie eine Kombination dieser Verfahren eingesetzt werden.

Alle im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Analyse von Unterschieden zwischen Tumorzellen und nicht-entarteten Zellen können erfindungsgemäß zur Identifizierung Tumor-spezifischer

Moleküle verwandt werden.

In einem zweiten Schritt wird das Zielmolekül identifiziert, das zur Dyslokation des Tumor-spezifischen Moleküls benutzt werden kann. Hierbei kann es sich wiederum um ein Protein, eine RNA oder ein DNA-Fragment handeln.

Das Screening-Verfahren wird vorzugsweise als Hochdurchsatzverfahren so angewandt, daß mittels automatischer Pipettierroboter tausende von Substanzen auf ihre Bindung an das Tumor-spezifische Molekül und an das Dyslokationsmolekül getestet werden. Ausgewählt werden dann Verbindungen, die jeweils mit hoher Affinität und Spezifität an eines der beiden Moleküle oder an beide zugleich binden. Werden zwei unterschiedliche Moleküle identifiziert (wobei eines an das Tumor-spezifische Molekül bindet und das andere die Dyslokation auslöst), so werden diese Moleküle durch chemische Verfahren, z.B. durch das Einführen eines Polylinkers gekoppelt. Ein großer Vorteil dieses Screeningverfahrens liegt darin, daß jedes Molekül nur an das Zielmolekül binden muß, aber nicht notwendigerweise auch die Funktion des Zielmoleküls beeinflussen muß.

In den nachfolgenden Beispielen wurde ein rekombinantes Fusionsprotein erzeugt, um die AML1-ETO-Repressoraktivität auf Promotoren zu richten, die für das Überleben und die Proliferation myeloischer Zellen essentiell sind. Ein hohes Maß an Spezifität wurde durch verschiedene Effekte erreicht. Die c-myb Bindungsstellen wurden als Ziel für GFP-M&M und AML1-ETO Repressorkomplexe genutzt. C-myb ist für hämatopoetische Zellen essentiell, jedoch nicht für die Entwicklung anderer Organe (Mucenski, 1991, Cell Vol.65, S.677-89).

Die essentielle Bedeutung des c-myb für Zellproliferationen leukämischer Zellen ist allgemein bekannt. Die Hemmung myb-abhängiger Gene stellt ein wesentliches Ziel der Leukämitherapie

dar (Mucenski, 1991, Cell Vol.65, S.677-89; Ratajczak, 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, S.118237; Gewirtz et al., 1988, Science, Vol.242, S.1303-6; Gewirtz A.M., 1999, Oncogene, Vol.18, 3056-62).

Die Experimente zeigen, daß das erfindungsgemäße Dyslokalisationsmolekül (hier ein rekombinantes Fusionsprotein) gegenüber Zellen, welche AML1-ETO nicht exprimieren, nicht toxisch ist. Eine hohe spezifische Toxizität wurde für Zellen erzielt, die tumorinduzierende Transformationen erlitten hatten.

Beschreibung der Figuren

Figur 1: Konstruktion eines AML1-ETO Dyslokalisationsproteins

- a Hypothese der Funktion eines chimären Proteins bestehend aus der DNA Bindungsdomäne von c-myb und der AML1 Bindungsdomäne von MEF.
- b Struktur des chimären Proteins und der Deletionsmutante.
- c Immunoblot-Nachweis aus Cos7-Zell-Lysaten mit einem Anti-GFP-Antikörper nach Transfektion der Zellen mit GFP, GFP-ΔM&M und GFP-M&M.

Figur 2: Spezifische Bindung des GFP-M&M an myb Bindungsstellen und Bindung von AML1-ETO in vitro. Zellkerneextrakte von Cos7-Zellen, die mit c-myb GFP-M&M und AML1-ETO transfiziert worden waren, wurden in "Elektrophoretischen Mobilitäts Shift Assays" (EMSA) analysiert. Kompetitions-Experimente mit spezifischen myb und unspezifischen Oligonukleotiden zeigen die Spezifität der GFP-M&M Bindung. Der Supershift von M&M, der durch die

Kotransfektion von GFP-M&M mit AML1-ETO entsteht, zeigt die Dyslokalisierung von AML1-ETO zu den myb Bindungsstellen.

Figur 3: Bindung des AML1-ETO an den endogenen c-kit Promotor mittels GFP-M&M. KCL22 Zellen wurden mit FLAG-AML1-ETO und GFP oder GFP-M&M transfiziert, DNA-bindende Proteine wurden mit Hilfe von Formaldehyd fest an DNA gekoppelt, die Zellen lysiert, die DNA fragmentiert und mit anti-FLAG oder unspezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Im immunpräzipitierten Chromatin wurden die Promotor-Sequenzen von c-kit und p14^{ARF} mit einer PCR detektiert. Ein repräsentatives von zwei Experimenten wird gezeigt.

Figur 4: Spezifische Repression des myb-abhängigen Promoters durch GFP-M&M in Anwesenheit von AML1-ETO. KCL22-Zellen wurden transient mit einem myb abhängigen Luciferase-Konstrukt und c-myb, AML1, AML1-ETO, GFP-ΔM&M und GFP-M&M (wie angezeigt) transfiziert. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Figur 5: GFP-M&M reprimiert Koloniewachstum in AML1-ETO exprimierenden Zellen.

- a 32D Zellen wurden mit GFP als Kontrolle oder AML1-ETO und GFP-M&M wie angegeben transfiziert und 1×10^5 Zellen in Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Die Photos zeigen repräsentative Kolonien an Tag 10.
- b 32D Zellen wurden wie angegeben transfiziert und im Kolonie-Nachweisverfahren ausgesiedelt. An Tag 10 wurden die Kolonien gezählt. Hier ist die

Repression des Koloniewachstums verglichen mit der Kontrolltransfektion mit GFP (als 1 gesetzt) dargestellt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Versuchen wird gezeigt.

- c AML1-ETO wurde alleine oder in Kombination mit GFP-M&M oder GFP-ΔM&M in 32D-Zellen transfiziert und anschließend für Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.
- d GFP oder GFP-M&M wurden in Kasumi-1-Zellen transfiziert, die natürlicherweise AML1-ETO exprimieren und in Kolonienachweisverfahren ausgesiedelt. Der Mittelwert und der Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt.

Figur 6: GFP-M&M induziert in AML1-ETO exprimierenden Zellen Apoptose. 32D Zellen wurden mit AML1-ETO, GFP-M&M oder beiden Vektoren transfiziert und anschließend wurden die transfizierten Zellen durch Durchflußzytometrie sortiert. Die transfizierten Zellen wurden dann in einem TUNEL-Nachweisverfahren analysiert.

- a Darstellung der FACS Ergebnisse für BrdU-positive, apoptotische Zellen. Die offenen Kurven stellen die Apoptoserate in Zellen, die zu Kontrollzwecken mit einem Leervektor transfiziert wurden, dar.
- b Dargestellung der Anteile von apoptotischen Zellen in den transfizierten 32D Zellen.

Materialien und Methoden

In den Beispielen wurden die folgenden Materialien und Methoden verwendet:

1. Plasmide:

Das GFP-M&M Expressionsplasmid in pcDNA3.1 wurde mittels PFU-Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung eines murinen c-myb Expressionsplasmides und von cDNA aus KCL22 Zellen als Template hergestellt, wobei spezifische Primer für die DNA-Bindungsdomäne von c-myb (kodiert von den Nukleotiden 193-594 der SEQ ID NO:13; umfassend die Restriktionsschnittstellen für KpnI und BamHI) und die AML1 Bindungsdomäne von MEF (kodiert von den Nukleotiden 251-618 der SEQ ID:12; umfassend Restriktionsschnittstellen für BamHI und EcoRI) verwendet wurden. Die PCR Produkte wurden in Leserichtung in GFP-pcDNA3.1 (GFP entspricht den Nukleotiden 91-813 von SEQ ID NO:11) kloniert. GFPAM&M wurde entsprechend kloniert, wobei ein PCR Fragment verwendet wurde, welchem die ersten 159 Basenpaare der DNA-Bindungsdomäne des c-Myb fehlten.

Primer für die AML1 Bindungsdomäne von MEF:

MEF-BamH1 for: 5'- ATA GGA TCC GCC ACC TCG CAC ACC ATG TCA-3' (SEQ ID NO: 3)

MEF-EcoR1 rev: 5'- CAG AAT TCG CCT TTG CCA TCC TTT GAT TTC-3' (SEQ ID NO: 4)

Primer für die DNA-Bindungsdomäne von c-myb:

myb-Kpn1 for: 5'- CAG AGA GGT ACC GTC ATT GCC AAT TAT CTG-3' (SEQ ID NO: 5)

myb-BamH1 rev: 5'- CAG AGA GGA TCC GTA GCC TTC CTG TTC CAC-3' (SEQ ID NO: 6)

Das myb-TK (Thymidinkinase) Luziferasekonstrukt war ein Geschenk von Prof. Dr. Klempnauer. Die AML1-ETO cDNA wurde in pcDNA3.1 subkloniert.

2. Zelllinien und Transfektion:

Die IL-3-abhängige murine myeloische Zelllinie 32Dcl3, die humanen myeloischen Zelllinien KCL22 und Kasumi-1, sowie die Affennieren Zelllinie Cos7 wurden nach im Stand der Technik bekannten Verfahren kultiviert. 32Dcl3 Zellen und KCL22 Zellen wurden durch Elektroporation mit 15 µg Plasmid DNA transfiziert und Cos-Zellen wurden unter Verwendung von Lipofectamin (Invitrogen) mit 5 µg Plasmid DNA transfiziert.

3. Immunoblotting:

Aus den mit den Expressionsvektoren für GFP, GFP-M&M oder GFP-ΔM&M transfizierten Cos-Zellen wurden Proteinlysate hergestellt. Die drei Proteine wurden unter Verwendung des monoklonalen murinen GFP-Antikörpers (Clontech, Heidelberg, Deutschland) nachgewiesen, wobei der Nachweis durch eine Inkubation mit Radieschen-Peroxidase konjugiertem sekundärem IgG-Antikörper gegen Maus IgG erfolgte (Jackson ImmunoResearch).

4. Elektrophoretischer Mobilitäts-Shift-Assay

Cos7-Zellen wurden mit einer Gesamtmenge von 5 µg der Expressionsvektoren für c-myb, AML1-ETO, GFP und GFP-M&M in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Die Herstellung von Zellkernextrakten der transfizierten Cos7-Zellen, die Bindungsreaktion und die Oligonukleotide, welche die c-myb Konsensus-Bindungssequenz aufweisen, sind in Müller et al., 1999, Blood, Vol.94, S. 4255-62, beschrieben. Für die competitiven Experimente wurden 100 ng doppelsträngiger Oligonukleotide verwendet, die entweder die myb Konsensusstelle oder eine unspezifische Bindungsstelle aufwiesen.

5. Chromatin Immunopräzipitation:

KCL22 Zellen wurden mit FLAG AML1-ETO und GFP oder GFP-M&M transfiziert. 12 Stunden nach der Transfektion wurden durch Zugabe von 1% Formaldehyd für 10 Minuten die zellulären Proteine

an die DNA gebunden und anschließend die Reaktion durch die Zugabe von 0,125 M Glycin beendet. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml RIPA Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren, 200 µM Natrium Orthovanadat und 50 µM NaF lysiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Chromatin mit Hilfe von UV-Strahlen fragmentiert (9 Pulse von 5 Sekunden). Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation abgetrennt und 50 µl wurden als "input"-Kontrolle aufbewahrt. Der Rest des Lysates wurde in 40 µl Protein A/G-Agarose mit 5 µg Kaninchen- und Maus-IgG vorgereinigt. Der Rest jedes Lysates wurde in zwei Proben aufgeteilt und die Immunopräzipitation wurde entweder unter Verwendung von 3 µg eines anti-FLAG oder Maus-IgG mit 40 µl Protein A/G-Agarose über Nacht durchgeführt. Die Immunokomplexe wurden achtfach in einem Puffer mit geringem Salzgehalt gewaschen (0,1% SDS, 150 µM NaCl, 1% Triton X-100, 2 µM EDTA, pH 8,0, 20 µM Tris-HCl, pH 8,1). Anschließend wurden die Verbindungen zwischen der DNA und den Proteinen in den Immunkomplexen und der "input"-Kontrolle wieder gelöst und die DNA aus der Lösung Phenol/Chloroform extrahiert. Dann wurden in den Proben spezifische Promotor-Sequenzen für die c-kit Promotor Region und die p14^{ARF} Promotor Region mittels PCR detektiert.

Die PCR wurde mit einer Taq-Polymerase (Promega) auf einem Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt (95°C für 3 Min., 37 Cyclen bei 95°C für 1 Min., 60°C für 1 Min. und 72°C für 1 Min.). Die Produkte wurden auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

Primer für die p14^{ARF} Promoter Region:

p14^{ARF} for: 5'-AGT GGC TAC GTA AGA GTG ATC GC-3' (SEQ ID NO: 7)
p14^{ARF} rev: 5'-CTT ACA GAT CAG ACG TCA AGC CC -3' (SEQ ID NO: 8)

Primer für die c-kit Promoter Region:

c-kit for: 5'- ACT GTT GTT GCT TTC CGT TCA A-3'
(SEQ ID NO: 9)
c-kit rev: 5'- TTA AGC CCG ATT TCA CTG CC-3'
(SEQ ID NO: 10)

6. Luziferase-Nachweis:

Der Nachweis der Promotoraktivität erfolgte nach im Stand der Technik bekannten Verfahren (Müller et al., 2000, Mol.Cell.Biol., Vol.20, S. 3316-29). Dabei wird eine Gesamtmenge von 15,5 µg Plasmid mittels Elektrophorese transfiziert. Die Mischung bestand aus 5 µg eines myb-TK Luziferasekonstrukt, 0,5 µg PRL-null Plasmid (Promega, Madison, WI) zur internen Standardisierung und 5 µg der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, GFP-AM&M und GFP-M&M in verschiedenen Kombinationen. Leervektor wurde zum Ausgleich der Gesamtmenge an transfizierter DNA mittransfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Firefly- und Renilla-Luziferase unter Verwendung des "Dual Luciferase Assay Systems" der Firma Promega detektiert. Die Renilla-Luziferase Aktivität wurde zur internen Standardisierung der Transfektionseffizienz benutzt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden die Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

7. Klonales Wachstum in Methylzellulose:

32Dcl3 Zellen und Kasumi Zellen wurden transient mit einer Gesamtmenge von 15 µg der Expressionsvektoren für AML1, AML1-ETO, GFP, GFP-M&M und GFPAM&M in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Um das klonale Wachstum zu untersuchen, wurden die transfizierten Zellen am Tag nach der Elektroporation über eine Gradienten-Zentrifugation separiert und in einer Konzentration von 1×10^5 lebenden Zellen pro 35 mm Platte in 1 ml eines Kultur-Mixes ausgesiedelt. Dieser Mix bestand aus "Isocove

modifiziertes Dulbecco Medium" (IMDM, Life Technologies, Grand Island, N.Y.), 1% Methylzellulose, 20% FCS, IL-3 (1ng/ml) und 0,6 mg/dl G418. Alle Versuche wurden dreifach angesetzt und die Kolonien am Tag 10 gezählt. Aus drei unabhängigen Experimenten (für die Kasumi Zellen zwei Experimente) wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet.

8. Apoptoseassay:

32Dc13 Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für GFP, GFP-M&M und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die GFP-positiven Zellen mittels Durchflußzytometrie aus den gesamten Zellen heraussortiert und weiter untersucht. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen innerhalb der GFP positiven Zellen wurde mittels eines TUNEL Assays (APO-BrdU Kit der Firma Pharmigen) bestimmt, wobei die Experimente nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt wurden. Die Ergebnisse von einem der drei unabhängigen Experimente mit ähnlichen Ergebnissen werden gezeigt.

Beispiel 1 Klonierung des GFP-M&M und Expression in Cos-Zellen

Ein Fusionsprotein aus dem "enhanced green fluorescent protein" (GFP, für Nachweiszwecke; kodiert von den Nukleotiden 91-813 der SEQ ID NO:11), der DNA Bindungsdomäne des murinen c-myb (die Nukleotide 193-594 der SEQ ID NO:13 kodieren für die Aminosäurereste 65-198 des murinen c-myb; vgl. Sakura et al., 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.86, S. 5758-61) und der AML1- Bindungsdomäne des humanen Myeloid elf like Faktors, MEF (die Nukleotide 251-618 der SEQ ID:12 kodieren für die Aminosäurereste 87-206 des humanen MEF; vgl. Mao S. et al., 1999, Mol.Cell.Biol., Vol.19, S.3635-44)) wurde konstruiert.

Der Transkriptionsfaktor c-myb ist dafür bekannt, daß er für eine

normale Hämatopoese und das Überleben der hämatopoetischen Zellen essentiell ist (Mucenski et al., 1991, Cell, Vol.65, S.677-89). Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmung des c-myb durch Antisense-Strategien oder c-myb Knock out Mäuse nicht in der Lage sind, eine normale Hämatopoese auszubilden (Ratajczak et al., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, Vol.89, S.11823-7).

Als zweiter Teil des chimären Proteins wurde die AML1 Bindungsdomäne des MEF (Myeloid like ELF factor) verwendet. Die Aminosäuren 87-206 des MEF binden stark an AML1 und AML1-ETO in vivo und in vitro (Mao S. et al.; 1999, Mol.Cell.Biol., Vol.19, S.3635-44). Alle drei Domänen wurden in Leserichtung in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert. Dieses Konstrukt wurde als GFP-M&M bezeichnet (Figur 1b). Für Kontrollzwecke wurde eine Deletionsmutante, welche die ersten 53 Aminosäuren der DNA Bindungsdomäne des c-myb nicht aufweist, hergestellt. Die Deletionsmutante wurde als GFP-ΔM&M bezeichnet.

Die Expression der rekombinanten Proteine wurde nach transienter Transfektion in Cos7-Zellen mittels Immunoblot-Nachweisverfahren unter Verwendung von Anti-GFP-Antikörper analysiert (GFP alleine 35 kDa, GFP-ΔM&M 80 kDa; GFP-M&M 85 kDa; Fig. 1c).

Beispiel 2 Analyse der Bindung von GFP-M&M an myb Bindungsstellen

Um die Interaktion des GFP-M&M mit myb DNA Bindungsstellen zu analysieren, wurden elektrophoretische Mobilitäts-Shift-Assays durchgeführt (vgl. Figur 2). Dafür wurden nukleäre Extrakte transient transfizierter Cos7-Zellen hergestellt. Ein doppelsträngiges myb-Consensus Oligonucleotid diente als Ziel-DNA. Diese Experimente zeigten, daß GFP-M&M ähnlich wie c-myb spezifisch an myb DNA-Bindungsstellen bindet. AML1-ETO alleine wies keine Bindung an die myb-Bindungsstellen auf, aber GFP-M&M führte zu einer Bindung von AML1-ETO an die DNA. Dies resultierte in einem Supershift des Komplexes bestehend aus DNA, GFP-M&M und AML1-ETO

(Fig.2).

Beispiel 3 GFP-M&M bindet AML1-ETO an den endogenen c-Kit Promotor

Die Bindung des GFP-M&M und die Bindung von AML1-ETO an endogene c-myb Ziel-Promotoren wurde unter Verwendung eines Chromatin Immunpräzipitations-Nachweisverfahrens (ChIP) in KCL22 Zellen analysiert.

Als c-myb abhängiger endogener Promotor wurde der c-kit Promotor gewählt. Als Positivkontrollé wurde die nachgewiesene Bindung von AML1-ETO an den p14^{ARF} Promotor analysiert (Linggi et al., Nature Medicine, 8 (7), Juli 2002)). Eine mit FLAG markierte Form des AML1-ETO wurde in Kombination mit GFP oder GFP-M&M in KCL22 Zellen exprimiert. Die Transkriptionsfaktoren wurden mit DNA unter Verwendung von Formaldehyd vernetzt. Nach Zell-Lyse und DNA Fragmentierung wurden DNA/AML1-ETO Komplexe unter Verwendung eines anti-FLAG-Antikörpers oder für Kontrollzwecke unspezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Die Vernetzung wurde aufgehoben und die Gegenwart der c-kit- und p14^{ARF}-Promotor DNA Sequenz wurde mittels PCR analysiert. Die Sequenz des c-kit Promotors war in den ChIP-Proben der KCL22 Zellen, die mit AML-ETO und GFP transfiziert worden waren, nicht nachweisbar.

In Gegenwart des GFP-M&M wurden jedoch die c-kit Promotor-Sequenzen mit AML1-ETO immunpräzipitiert (Fig.3). Im Gegensatz dazu wurde die p14^{ARF} Promotorsequenz in Immunkomplexen aus KCL22 Zellen nachgewiesen, die mit AML1-ETO und GFP transfiziert worden waren. Die Sequenz wurde nicht in Gegenwart von AML1-ETO und GFP-M&M nachgewiesen (Fig.3).

Diese Ergebnisse zeigen, daß GFP-M&M AML1-ETO an den endogenen c-myb abhängigen Promotor c-kit in vivo binden kann.

Beispiel 4 Hemmung von myb abhängigen Promotoren in Gegenwart von GFP-M&M und AML1-ETO

GFP-M&M bindet an myb abhängige Promotoren, bildet mit AML1-ETO (soweit vorhanden) einen Komplex und inhibiert dadurch die Genexpression.

Als weiterer Nachweis wurden Luziferase-Assays durchgeführt, wobei das Luziferasé-Gen unter der Kontrolle eines minimalen Thymidin-Kinase-Promotors mit drei zusätzlichen myb DNA-Bindungsstellen stand (Ziebold et al., 1997, Curr.Biol., Vol.7, S. 253-60). KCL22 Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten und GFP, GFP-M&M und AML1-ETO in verschiedenen Kombinationen transfiziert (Fig.4). Keines der Proteine war alleine in der Lage, die Luziferase-Aktivität wesentlich zu beeinflussen. Zellen, die GFP-M&M und AML1-ETO zusammen exprimieren, zeigten jedoch eine mehr als 5-fache Hemmung der Promotor-Aktivität (Fig.4). Anschließend wurde analysiert, ob die funktionale Interaktion zwischen GFP-M&M und myb DNA Bindungsstellen für die Hemmung der Luziferase-Aktivität mittels GFP-M&M in AML1-ETO positiven Zellen notwendig war. Die Mutation der DNA Bindungsstelle in GFP-AM&M hemmt die DNA Bindung des rekombinanten Proteins, wobei jedoch die Expression des Proteins nicht verändert wird (Figur 1b). Weder die Expression von GFP-AM&M alleine, noch die Expression von GFP-AM&M und AML1-ETO zusammen hemmten die Luziferase-Aktivität.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die GFP-M&M Bindung an die DNA für die Repression des myb abhängigen Gens in Gegenwart von AML1-ETO notwendig ist (Fig.4).

Beispiel 5 Hemmung des Koloniewachstums durch GFP-M&M in AML1-ETO exprimierenden Zellen

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors Myb und die Expression der myb abhängigen Gene sind für das Wachstum und die Proliferation

hämatopoetischer Zellen essentiell (White et al., 2000, Oncogene, Vol.19, S.1196-205). Daher wurde die Wirkung von GFP-M&M auf die Proliferation und Überlebensrate der AML1-ETO enthaltenden Zellen analysiert.

Zunächst wurde die Fähigkeit der transfizierten hämatopoetischen 32D Zellen zur Kolonienbildung untersucht. Das Koloniewachstum wurde in Zellen, die mit AML1, GFP-M&M oder AML1 und GFP-M&M transfiziert worden waren, nicht gehemmt.

Zellen, die mit AML1-ETO alleine transfiziert worden waren, zeigten eine sechsfache Hemmung des Kolonienwachstums, welche wahrscheinlich auf den toxischen Effekt des AML1-ETO selbst zurückzuführen ist (Muller et al., Mol.Cell.Bio., 2000, Vol.20., S.3316-29). Transfektion der 32D Zellen mit GFP-M&M in Gegenwart von AML1-ETO reduzierte jedoch das Wachstum der Kolonien etwa um das 60fache (Figur 5a und b). Im Vergleich zu GFP-M&M und GFP-ΔM&M in Kolonie-Assays wurde festgestellt, daß eine gemeinsame Expression von GFP-M&M und AML1-ETO die relative Anzahl der Kolonien um mehr als 80% reduzierte. Im Gegensatz dazu inhibierten GFP-ΔM&M und AML1-ETO nicht das Kolonienwachstum (Fig.5c). Die letztere Beobachtung zeigt, daß eine funktionale Interaktion zwischen GFP-M&M und myb DNA-Bindungsstellen für die Hemmung des Kolonienwachstums in AML1-ETO positiven Zellen notwendig ist.

Neben den Wirkungen von GFP-M&M in AML1-ETO transfizierten Zellen wurde auch die Aktivität von GFP-M&M in t(8;21) positiven Kasumi-1 Leukämiezellen untersucht. Das Koloniewachstum wurde nach Transfektion mittels GFP-M&M im Vergleich zu Zellen, die mit GFP-pcDNA3.1 alleine (Kontrolle) transfiziert worden waren, um das 12fache reduziert (Fig.5d).

Beispiel 6

Induktion der Apoptose durch GFP-M&M in AML1-ETO enthaltenden Zellen

Hämatopoetische Zellen, die keine c-myb Aktivität aufweisen, unterliegen der Apoptose (Taylor et al., 1996, Genes Dev., Vol.10, S.2732-44).

Um die Wirkung von GFP-M&M in AML1-ETO positiven Zellen und deren Einfluß auf die Apoptose zu untersuchen, wurde die Gegenwart von DNA Strangbrüchen mittels TUNEL-Assay untersucht. 32D-Zellen wurden mit GFP, AML1-ETO oder GFP-M&M oder mit einer Kombination aus AML1-ETO und GFP-M&M transfiziert. Nach 24 Stunden befanden sich etwa 10% der Zellen, die GFP, AML1-ETO oder GFP-M&M allein exprimieren, in Apoptose. Im Gegensatz dazu betrug der Prozentsatz apoptotischer Zellen unter den Zellen, die sowohl AML1-ETO als auch GFP-M&M exprimierten, 39%. Dies entspricht einer vierfachen Zunahme der Apoptoserate (Fig.6a und b).

Patentansprüche

1. Verbindung, die Bindungsaffinität für ein Tumor spezifisches Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
2. Verbindung gemäß Anspruch 1, die ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, oder ein organisches Molekül mit einem Molekulargewicht von < 5000, < 1000 oder < 500 ist.
3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in der das Tumorspezifische Moleköl ein Peptid, Oligopeptid, Protein, Fusionsprotein, RNA oder DNA ist.
4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, die eine Bindungsaffinität in 10^{-5} - 10^{-12} , und besonders bevorzugt von 10^{-7} bis 10^{-9} aufweist.
5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in der das Tumör-spezifische Moleköl in gesunden Zellen nicht oder in anderer Form vorliegt.
6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, in der das Tumorspezifische Moleköl ein Fusionsprotein ist.
7. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, in der das Tumor-spezifische Moleköl AML1-ETO ist.
8. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, in der das Tumorspezifische Moleköl eine DNA-Bindungsdomäne, ein Signalpeptid, Kinaseaktivität, Chromatinmodulatorische Eigenschaften, Protein-Proteininteraktionsdomänen oder Transkriptionelle Eigenschaften aufweist.

9. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, in der die Dyslokalisation das Wachstum Tumor-spezifischer Zellen inhibiert.
10. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, in der die Dyslokalisation in Tumor-spezifischen Zellen Apoptose induziert.
11. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, in der die Dyslokalisation das Tumor-spezifische Molekül an eine Nukleinsäuresequenz bindet, welche die Transkription eines Gens reguliert.
12. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, in der die Dyslokalisation das Tumor-spezifische Molekül an eine Nukleinsäuresequenz bindet, welche die Transkription eines Gens reguliert, wodurch die Transkription des Gens aktiviert oder inhibiert wird.
13. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, in der die Verbindung die Peptidsequenz der c-myb DNA-Bindungsdomäne umfaßt.
14. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, in der die Verbindung die Peptidsequenz der AML-1-Bindungs-domäne des "myeloid elf like factor" umfaßt.
15. Verbindung gemäß Anspruch 13 oder 14, in der die Verbindung die Peptidsequenz der c-myb DNA-Bindungsdomäne und die Peptidsequenz der AML-1-Bindungsdomäne des "myeloid elf like factor" umfaßt.
16. Verbindung gemäß Anspruch 15, in der die Verbindung die in SEQ ID NO: 1 gezeigte Sequenz aufweist.

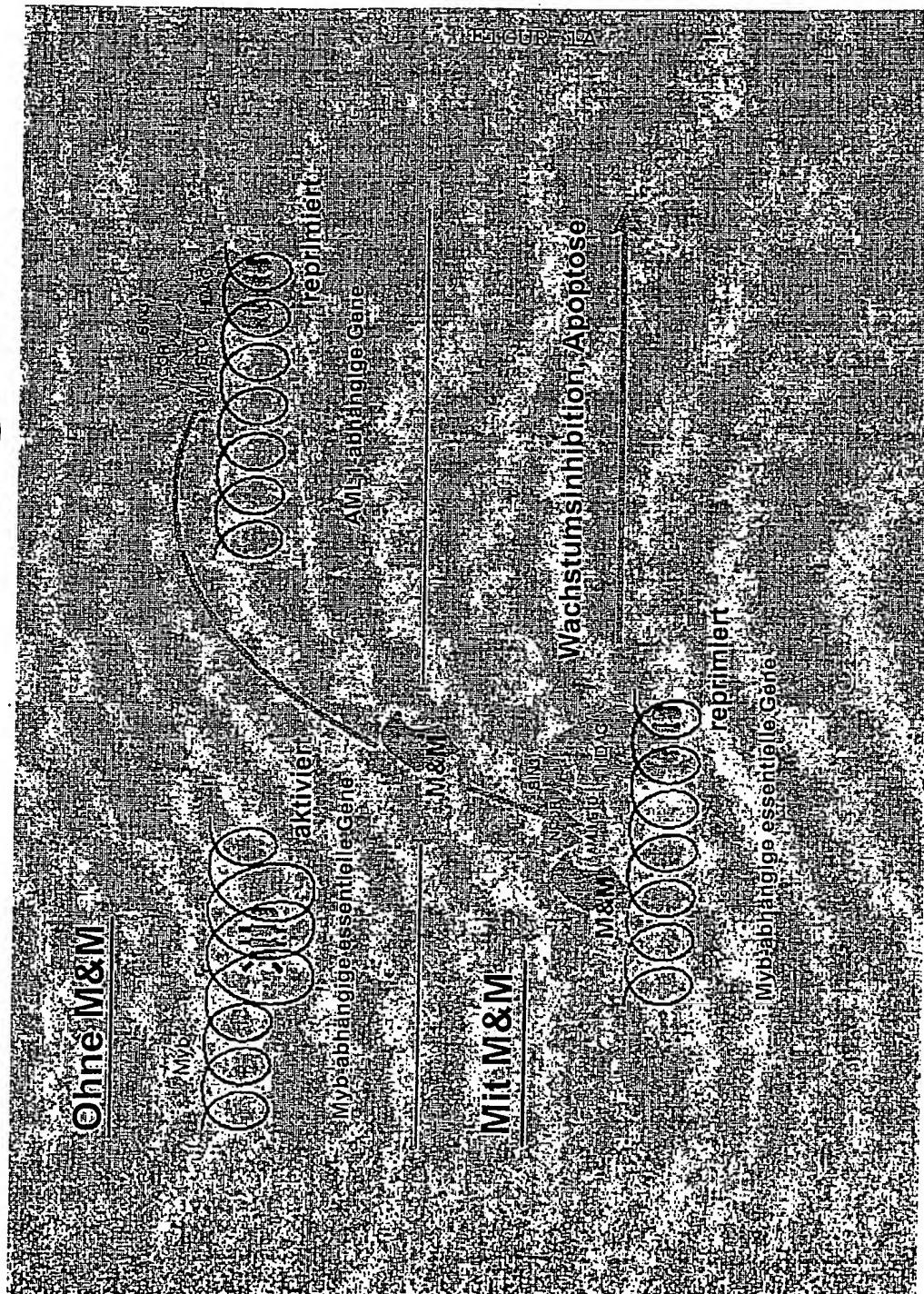
17. Nukleinsäure, die für ein Peptid oder Protein gemäß einem der Ansprüche 2 bis 16 kodiert.
18. Nukleinsäure gemäß Anspruch 17, die eine DNA oder RNA ist.
19. Vektor, der eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 umfaßt.
20. Wirtszelle, die eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18 oder einen Vektor gemäß Anspruch 19 aufweist.
21. Arzneimittel, das eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18, einen Vektor gemäß Anspruch 19 oder eine Wirtszelle gemäß Anspruch 20 umfaßt.
22. Arzneimittel gemäß Anspruch 21, das ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger umfaßt.
23. Arzneimittel gemäß Anspruch 21 oder 22, das zur oralen, intravenösen oder intramuskulären Verabreichung formuliert ist.
24. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, einer Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 17 oder 18, eines Vektors gemäß Anspruch 19 oder einer Wirtszelle gemäß Anspruch 20 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Tumoren.
25. Verwendung gemäß Anspruch 24, wobei der Tumor Leukämie, insbesondere Akute Myeloische Leukämie ist.
26. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, bei dem man das Peptid oder Protein rekombinant exprimiert oder durch Proteinsynthese gewinnt.

27. Verfahren zur Identifizierung einer Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, bei dem man:
- (a) ein Tumor-spezifisches Molekül identifiziert;
 - (b) eine Verbindung identifiziert, die eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
28. Verfahren gemäß Anspruch 27, bei dem man das Tumor-spezifische Moleköl mittels Microarray-Analysen, 2D-Proteingelektrophoresen mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung oder einer Kombination der genannten Verfahren identifiziert.
29. Verfahren gemäß Anspruch 27 oder 28, bei dem die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Moleköl aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, ein Protein, eine RNA eine DNA oder eine organische Verbindung ist.
30. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, bei dem man die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Moleköl aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, mittels Hochdurchsatz-Screening-Verfahren identifiziert.
31. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 27 bis 29, bei dem die Verbindung, welche eine Bindungsaffinität für das Tumor-spezifische Moleköl aufweist und eine Dyslokalisation des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann, aus zwei Teilen zusammengesetzt wurde.

32. Verfahren gemäß Anspruch 31, bei dem ein Teil der Verbindung eine Bindungssaffinität für das Tumor-spezifische Molekül aufweist und der zweite Teil die Dyslokalisierung des Tumor-spezifischen Moleküls bewirken kann.
33. Verfahren gemäß Anspruch 31 oder 32, bei dem die zwei Teile in getrennten Screening-Verfahren identifiziert werden.
34. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, Schritte umfassend, bei denen man:
 - (a) eine Verbindung, die zur Behandlung von Tumoren geeignet ist, mittels eines Verfahrens gemäß den Ansprüchen 27 bis 33 identifiziert;
 - (b) die Verbindung synthetisch oder rekombinant herstellt; und
 - (c) die Verbindung zu einem Arzneimittel formuliert.
35. Verfahren gemäß Anspruch 34, bei dem das Arzneimittel zur Behandlung von Tumoren, beispielsweise zur Behandlung von Leukämie und insbesondere zur Behandlung Akuter Myeloischer Leukämie geeignet ist.

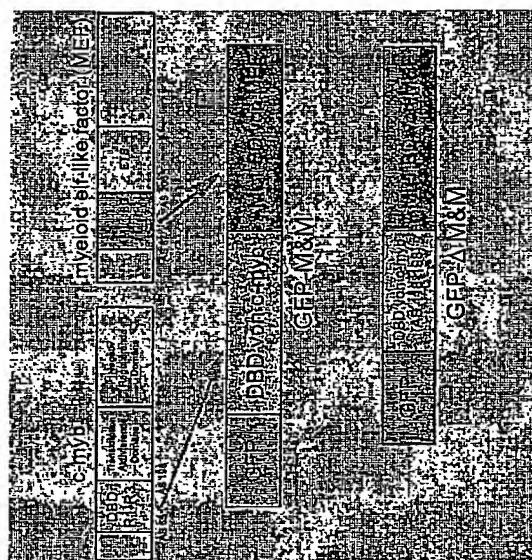
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Dyslokalisationsmoleküle, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung von Tumoren.



2/12

FIGUR 1B



86KD-

32KD-

WIND
WIND
WIND
WIND
WIND

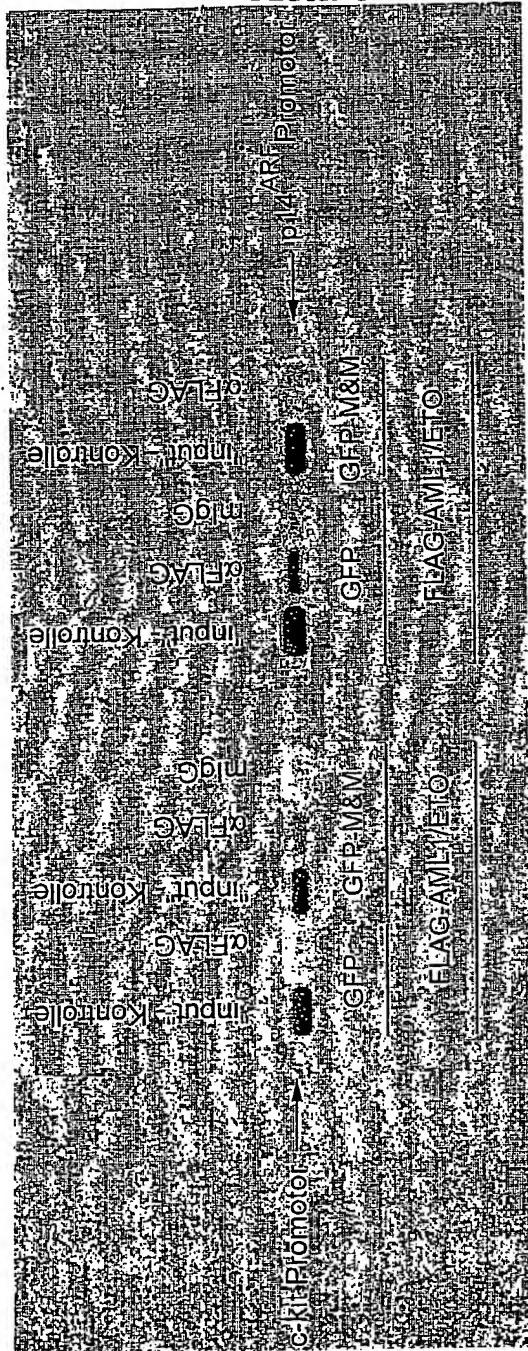
FIGURE 1C

4/12

FIGUR 2

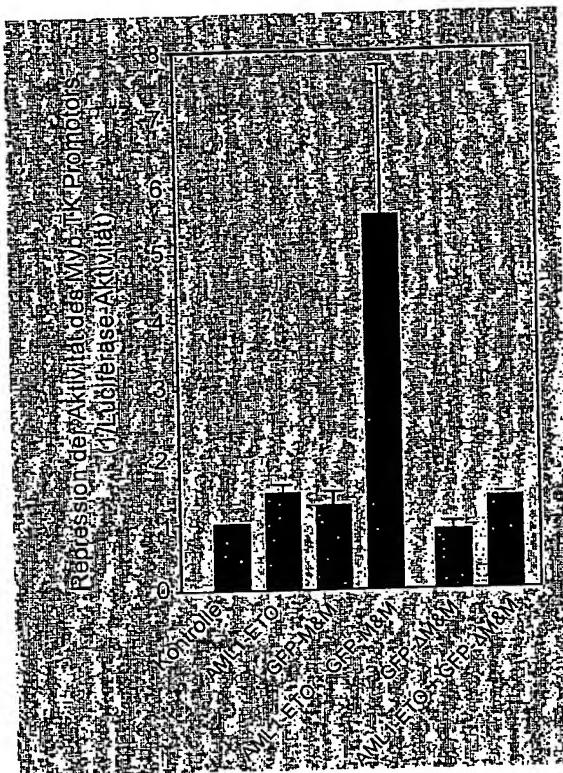


FIGUR 3



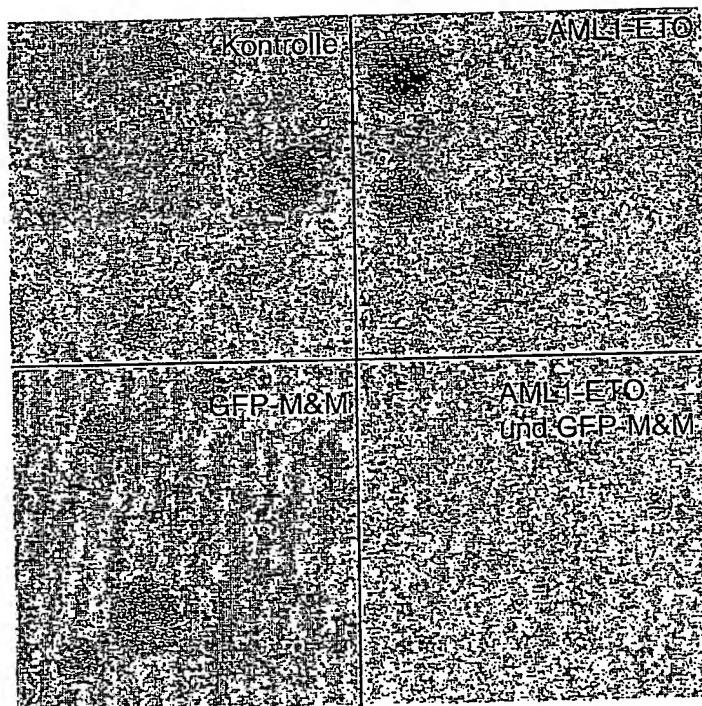
6/12

FIGUR 4

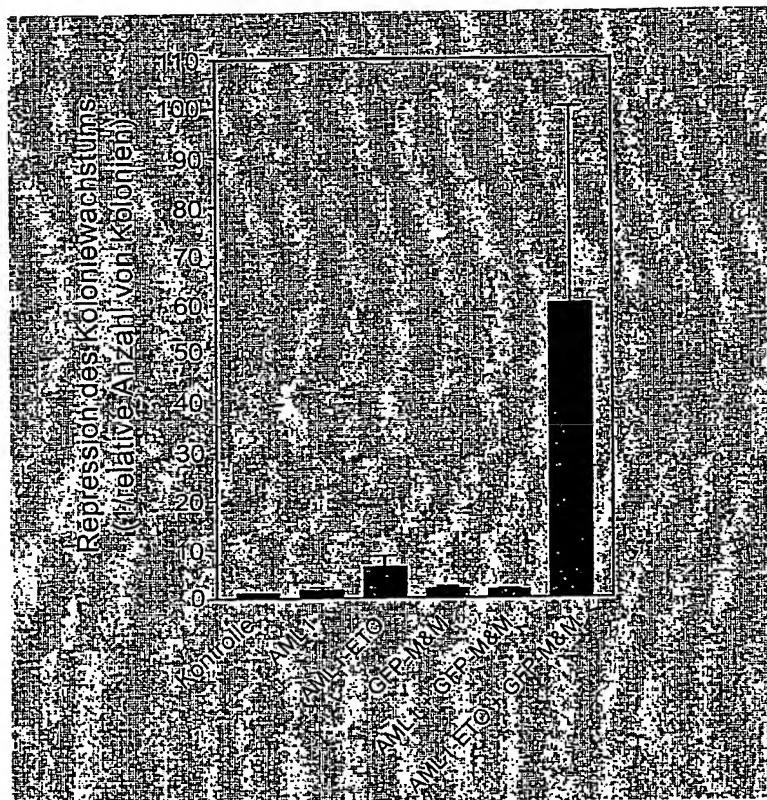


7/12

FIGUR 5A

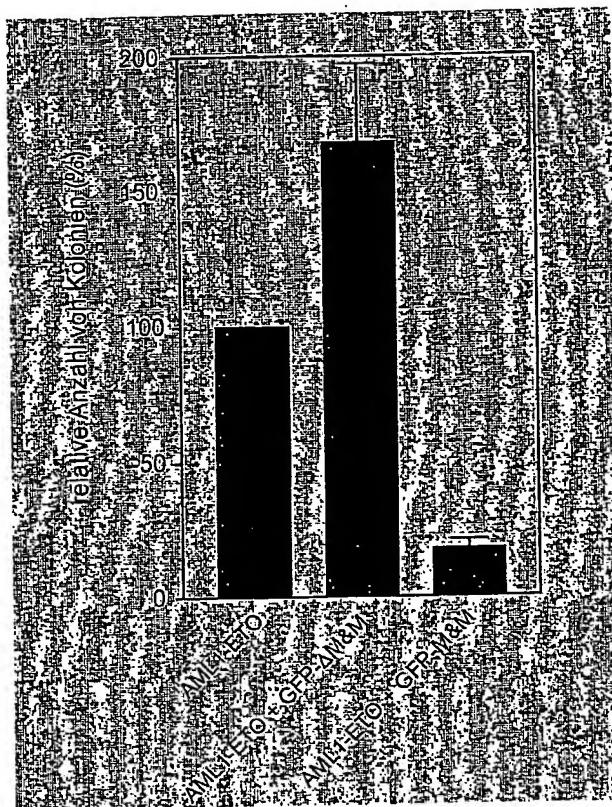


FIGUR 5B



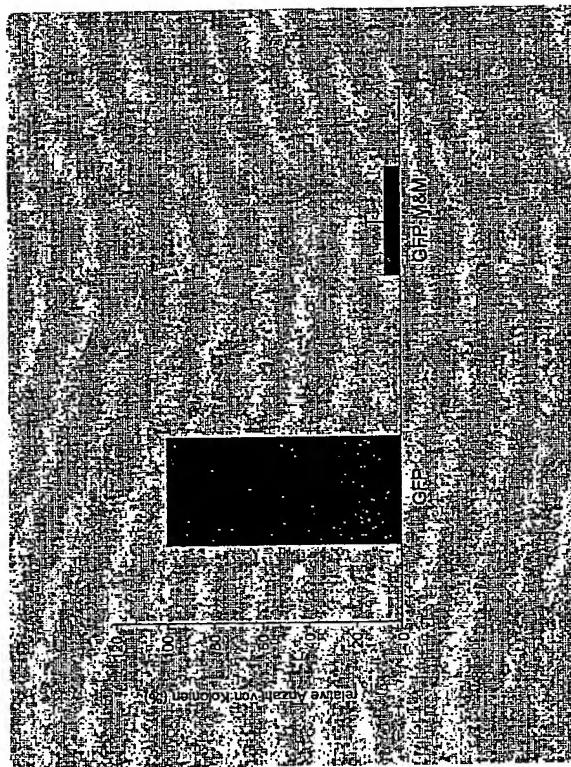
9/12

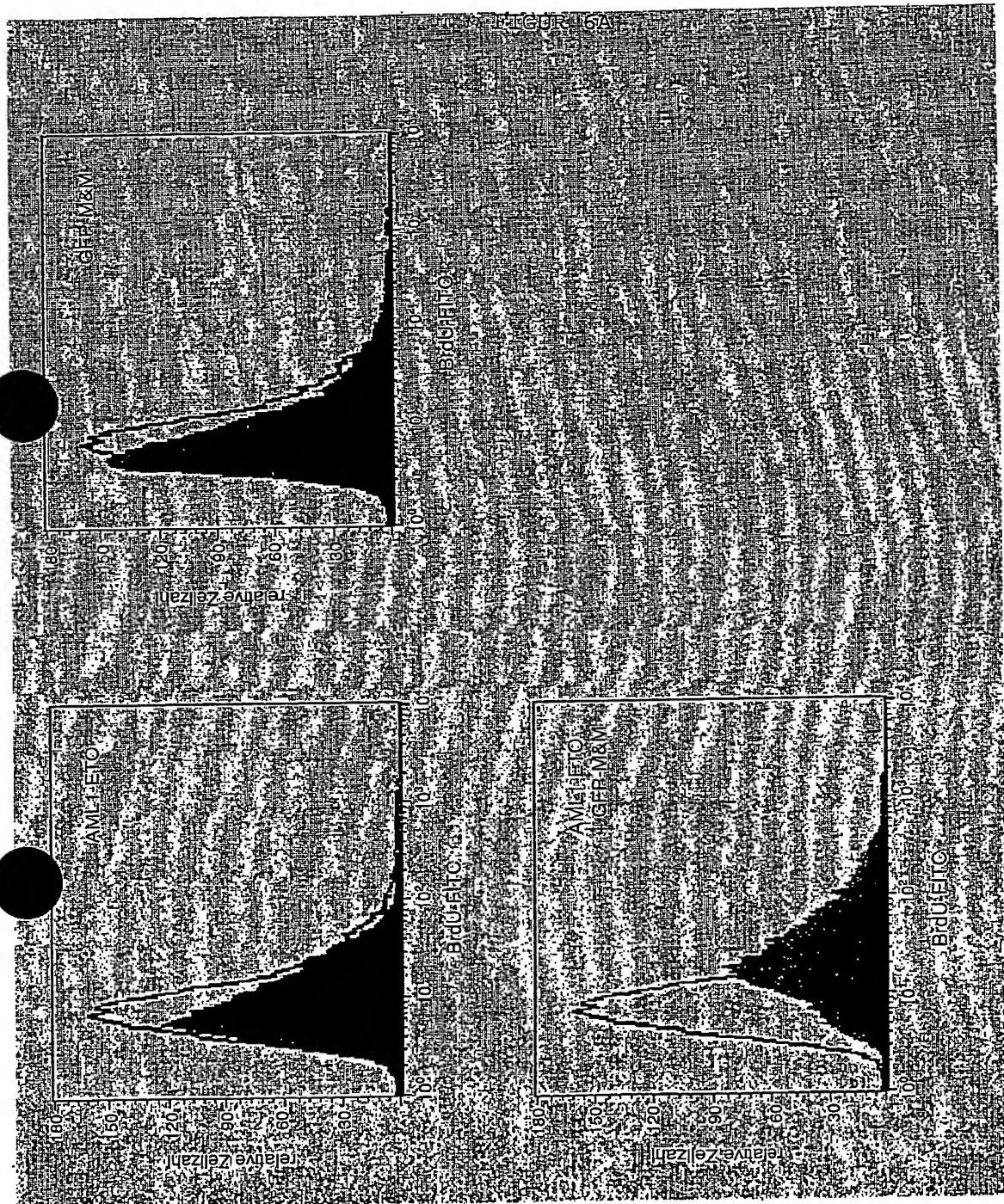
FIGUR 5C



10/12

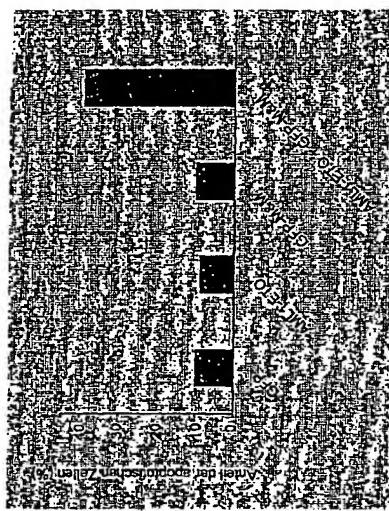
FIGUR 5D





12/12

FIGUR 6B



Sequenzprotokoll

<110> E. Berdel, C. Müller-Tidow, H. Serve, B. Steffen

<120> Dyslokationsmoleküle und deren Verwendung

<130> P057744

<160> 13

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 497

<212> PRT

<213> künstliche Sequenz

<223> Aminosäuresequenz von GFP-M&M

<400> 1

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
50 55 60

Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
65 70 75 80

Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
85 90 95

Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145 150 155 160

Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly
225 230 235 240

Thr Val Ile Ala Asn Tyr Leu Pro Asn Arg Thr Asp Val Gln Cys Gln
245 250 255

His Arg Trp Gln Lys Val Leu Asn Pro Glu Leu Ile Lys Gly Pro Trp
260 265 270

Thr Lys Glu Glu Asp Gln Arg Val Ile Glu Leu Val Gln Lys Tyr Gly
275 280 285

Pro Lys Arg Trp Ser Val Ile Ala Lys His Leu Lys Gly Arg Ile Gly
290 295 300

Lys Gln Cys Arg Glu Arg Trp His Asn His Leu Asn Pro Glu Val Lys
305 310 315 320

Lys Thr Ser Trp Thr Glu Glu Asp Arg Ile Ile Tyr Gln Ala His
325 330 335

Lys Arg Leu Gly Asn Arg Trp Ala Glu Ile Ala Lys Leu Leu Pro Gly
340 345 350

Arg Thr Asp Asn Ala Ile Lys Asn His Trp Asn Ser Thr Met Arg Arg
355 360 365

Lys Val Glu Gln Glu Gly Tyr Gly Ser Ala Thr Ser His Thr Met Ser
370 375 380

Thr Ala Glu Val Leu Leu Asn Met Glu Ser Pro Ser Asp Ile Leu Asp
385 390 395 400

Glu Lys Gln Ile Phe Ser Thr Ser Glu Met Leu Pro Asp Ser Asp Pro
405 410 415

Ala Pro Ala Val Thr Leu Pro Asn Tyr Leu Phe Pro Ala Ser Glu Pro
420 425 430

Asp Ala Leu Asn Arg Ala Gly Asp Thr Ser Asp Gln Glu Gly His Ser
435 440 445

Leu Glu Glu Lys Ala Ser Arg Glu Glu Ser Ala Lys Lys Thr Gly Lys
450 455 460

Ser Lys Lys Arg Ile Arg Lys Thr Lys Gly Asn Arg Ser Thr Ser Pro
465 470 475 480

Val Thr Asp Pro Ser Ile Pro Ile Arg Lys Lys Ser Lys Asp Gly Lys
485 490 495

Gly

<210> 2
<211> 1491
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz

<223> Nukleotidsequenz von GFP-M&M

<400> 2
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatacctgggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacacctac 120
ggcaagctgá ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgccccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgaa ccacatgaag 240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgcg gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgcccc aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcgcc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagggt 720
accgtcattg ccaatttatct gccccacccgg acagatgtgc agtgccaaca ccggtggcag 780
aaagtgctga accctgaact catcaaaggt ccctggacca aagaagaaga tcagagagtc 840
atagagttg tccagaaata tggtccgaag cgttggctcg ttattgccaa gcactaaaaa 900

gggagaattg gaaagcagtg tcgggagagg tggcacaacc atttgaatcc agaagttaag	960
aaaacctcct ggacágaaga ggaggacaga atcatttacc aggcacacaa gcgtctgggg	1020
aacagatggg cagagatcgc aaagctgctg cccggacgga ctgataatgc tatcaagaac	1080
cactggaatt ccaccatgctg tcgcaaggtg gaacaggaag gctacggatc cgccacctcg	1140
cacaccatgt caacccgcca agtcttactic aatatggagt ctcccagcga tatcctggat	1200
gagaagcaga tcttcagtaa ctccgaaatg cttcoagact cggaccctgc accagctgtc	1260
actctgccc actacctgtt tctgcctt gagcccgatg ccctgaacag ggccgggtgac	1320
actagtgacc aggagggca ttctctggag gagaaggcct ccagagagga aagtgc当地	1380
aagactgggaa atcaaagaa gagaatccgg aagaccaagg gcaaccgaag tacctcacct	1440
gtcactgacc ccägcatccc cattaggaag aaatcaaagg atggcaaagg c	1491

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<223> Oligonukleotidprimer MEF-BamHI for
<400> 3
ataggatccg ccacctcgca caccatgtca 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<223> Oligonukleotidprimer MEF-EcoRI rev
<400> 4
cagaatttcgc ctttgccatc ctttgatttc 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<223> Oligonukleotidprimer myb-KpnI for
<400> 5
cagagaggta ccgtcattgc caattatctg 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> künstliche Sequenz
<223> Oligonukleotidprimer myb-BamHI rev
<400> 6

cagagaggat ccgttagcctt cctgttccac	30
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<223> Oligonukleotidprimer p14 ^{AFP} for	
<400> 7 agtggctacg taagagtgtat cg	23
<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<223> Oligonukleotidprimer p14 ^{AFP} rev	
<400> 8 cttacagatc agacgtcaag ccc	23
<210> 9	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<223> Oligonukleotidprimer c-kit for	
<400> 9 actgttgttg ctttccgttc aa	22
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<223> Oligonukleotidprimer c-kit rev	
<400> 10 ttaagccccga tttcactgcc	20
<210> 11	
<211> 4151	
<212> DNA	
<213> künstliche Sequenz	
<223> cDNA EGFP	
<400> 11 tagttattac tagcgctacc ggactcagat ctcgagctca agcttcgaat tctgcagtcg	60
acggtaaccgc gggcccgggga tccaccggtc gccaccatgg tgagcaaggg cgaggagctg	120
ttcacccgggg tggtgcccat cctggtcgag ctggacggcg acgtaaaacgg ccacaagttc	180

agcgtgtccg	gcgaggcgaa	gggcgatgcc	acctacggca	agctgaccct	gaagttcatc	240
tgcaccacccg	gcaagctgcc	cgtgcccctgg	cccacccctcg	tgaccaccct	gacctacggc	300
gtgcagtgtct	tcagcccgcta	ccccgaccac	atgaagcagc	acgacttctt	caagtccgccc	360
atgcccgaag	gctacgtcca	ggagcgcacc	atcttcttca	aggacgacgg	caactacaag	420
accccgcccg	aggtgaagtt	cgagggcgac	accctggtga	accgcatacg	gctgaaggc	480
atcgacttca	aggaggacgg	caacatcctg	gggcacacaagc	tggagtacaa	ctacaacagc	540
cacaacgtct	atatcatggc	cgacaagcag	aagaacggca	tcaaggtgaa	cttcaagatc	600
cggccacaaca	tcgaggacgg	cagcgtgcag	ctcgccgacc	actaccagca	gaacacccccc	660
atcggcgacg	gccccgtct	gctgcccgcac	aaccactacc	tgagcacccca	gtccgcccctg	720
agcaaagacc	ccaacgagaa	gcgcgatcac	atggtcctgc	tggagttcgt	gaccggccgc	780
gggatcactc	tcggcatgga	cgagctgtac	aagtaaagcg	gccgcgactc	tagatcataa	840
tcagccatac	cacatttgc	gaggtttac	ttgctttaaa	aaacctccca	cacccccc	900
tgaacctgaa	acataaaatg	aatgcaattt	ttgttgtttaa	cttgcatttatt	gcagcttata	960
atggttacaa	ataaaagcaat	agcatcaca	atttcacaaa	taaagcattt	ttttcactgc	1020
attctagttt	tgggttgtcc	aaactcatca	atgtatctt	aggcgttaat	tgtaagcgtt	1080
aatattttgt	taaaaattcgc	gttaaatttt	tgttaaatca	gctcattttt	taaccaatag	1140
gccgaaatcg	gcaaaaatccc	ttataaaatca	aaagaataga	ccgagatagg	gttgagtgtt	1200
gttccagttt	ggaacaagag	tccactatta	aagaacgtgg	actccaaacgt	caaaggcga	1260
aaaaccgtct	atcagggcga	tggcccaacta	cgtgaaccat	caccctaatac	aagtttttg	1320
gggtcgaggt	gccgtaaagc	actaaatcg	aaccctaaag	ggagccccc	attttagagct	1380
tgacggggaa	agccggcgaa	cgtggcgaga	aaggaaggga	agaaagcga	aggagcgggc	1440
gctagggcgc	tggcaagtgt	agcggtcacg	ctgcgcgtaa	ccaccacacc	cgccgcgtt	1500
aatgcgcgc	tacagggcgc	gtcaggtggc	actttcggg	gaaatgtgcg	cggaacccct	1560
atttgtttat	ttttcttaat	acattcaat	atgtatccgc	tcatgagaca	ataaccctga	1620
taaatgttcc	aataatattt	aaaaaggaag	agtcttgagg	cgaaaagaac	cagctgtgg	1680
atgtgtgtca	gttagggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgc	1740
gcatgcac	caatttagtca	gcaaccagg	gtggaaagtc	cccaggctcc	ccagcaggca	1800
gaagtatgca	aagcatgc	ctcaatttagt	cagcaaccat	agtccgc	ctaactccgc	1860
ccatcccgcc	cctaactccg	cccagttccg	cccattctcc	gccccatggc	tgactaattt	1920
tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	cggcctctga	gttattccag	aagttagtgag	1980
gaggctttt	tggaggccta	ggcttttgc	aagatgcata	aagagacagg	atgaggatcg	2040

tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcagggtctc cggccgcttg ggtggagagg 2100
ctattcggt atgactgggc acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg 2160
ctgtcagcgc agggcgccc gggttctttt gtcaagaccg acctgtccgg tgccctgaat 2220
gaactgcaag acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca cgacgggcgt tccttgcga 2280
gctgtgtcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg 2340
gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgcct cctggcaga aagtatccat catggctgat 2400
gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa 2460
catcgcatcg agcgagcagc tactcggatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgatctg 2520
gacgaagagc atcagggct cgccgcagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgagcatg 2580
ccgcacggcg aggatctcg cgtgacccat ggcgatgcct gcttgcggaa tatcatggtg 2640
aaaaatggcc gctttctgg attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat 2700
caggacatag cggtggctac ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac 2760
cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc 2820
cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tgggttcga aatgaccgac caagcgacgc 2880
ccaacctgcc atcacgagat ttgcattcca ccgcgcctt otatgaaagg ttgggttcg 2940
gaatcggttt ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt 3000
tcttcgcccc ccctaggggg aggctaactg aaacacggaa ggagacaata ccggaaggaa 3060
cccgcgctat gacggcaata aaaagacaga ataaaacgcgca cgggtttggg tcgtttgttc 3120
ataaaacgcgg ggttcggtcc cagggctggc actctgtcga taccccccaccc agacccatt 3180
ggggccaaata cgcccgctt tcttcctttt ccccaaaaaa ccccccacccat tcgggtgaag 3240
gccccagggt cgcagccaac gtcggggcgg cagggcctgc catagcctca ggttactcat 3300
atatacttta gattgattta aaacttcattt tttaaatttaa aaggatcttag gtgaagatcc 3360
tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttgcgttccac tgagcgctcag 3420
accccgtaga aaagatcaaa ggtatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct 3480
gtttgcaaaac aaaaaaaacca ccgttaccag cgggtgtttt tttgcggat caagagctac 3540
caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgcga gataccaaat actgtccttc 3600
tagttagcc gtagtttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct acataacctcg 3660
ctctgctaat cctgttacca gtggctgtcg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt 3720
tggactcaag acgatagttt ccggataagg cgcagcggc gggctgaacg ggggggttcgt 3780
gcacacagcc cagcttggag cgaacgaccc acaccgaact gagataccctt cagcgtgagc 3840
tatgagaaag cgccacgcctt cccgaaggga gaaaggcggg caggtatccg gtaagcggca 3900

gggtcggAAC	aggagAGCgc	acgagGGAGc	ttccAGGggg	aaACGCTgg	tATCttATA	3960
gtcctgtcgG	gttCGCCAC	ctctGACTTG	agcGTcGATT	tttGtGATGc	TcGTcAGGgg	4020
ggcggAGGcT	atggaaaaAC	gccAGCAACG	cggCCTTTT	acgGTTcCTG	GCCTTTGCT	4080
ggcCTTTGc	tcACATGTTc	tttCCTGEGT	tATCCCTGA	ttCTGTGGAT	aACCgtATTa	4140
ccGCCATGca	T					4151

<210> 12
<211> 1992
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<223> cDNA MEF

<400>	12					
atggcttatta	ccctacagcc	cagtgaccotg	atctttgagt	tcgcaagcaa	cgggatggat	60
gatgataatcc	accagctgga	agaccctct	gtgtcccag	ctgtgatcgt	ggagcaggta	120
ccctacccctg	atttactgca	tctgtactcg	ggactggagt	tggacgacgt	tcacaatggc	180
atcataaacag	acgggacctt	gtgcatgacc	caggatcaga	tcctggaagg	cagtttttg	240
ctgacagatg	acaatgaggc	cacctcgac	accatgtcaa	cccgccaagt	cttactcaat	300
atggagtctc	ccagcgatat	cctggatgag	aagcagatct	tcagtacctc	cgaaatgctt	360
ccagactcgg	acctgcacc	agctgtact	ctgcccaact	acctgtttcc	tgccctctgag	420
cccgatgccc	tgaacagggc	gggtgacact	agtgaccagg	aggggcattc	tctggaggag	480
aaggcctcca	gagagggaaag	tgccaagaag	actggaaat	caaagaagag	aatccggaag	540
accaaggggca	acccaaagtac	ctcacctgtc	actgacccca	gcatacccat	taggaagaaa	600
tcaaaggatg	gcAAaggcag	caccatctat	ctgtggagT	tcctcctggc	tcttctgcaa	660
gacagaaaaca	cctgtcccaa	gtacatcaag	tggacccagc	gagagaaagg	catcttcaaa	720
ctggtgact	ccaaagctgt	gtccaaagctg	tgggggaagc	agaaaaaaca	gcctgacatg	780
aactatgaga	caatggggcg	ggcactaaga	tactactacc	aaagaggcat	actggccaaa	840
gtggaaaggc	agaggctggT	gtaccagttt	aaggagatgc	ccaaggacct	ggtggtcatt	900
gaagatgagg	atgagagcag	cgaagccaca	gcagccccac	ctcaggcctc	cacggcctt	960
gtggcccttg	ccagtaccac	ccggcgaacc	agctccaggg	tctcatccag	atctgcccc	1020
cagggcaagg	gcagctttc	ttgggagaag	ccaaaaattc	agcatgtogg	tctccagcc	1080
tctgcgagtc	tggaaattggg	accgtcgcta	gacgaggaga	tccccactac	ctccaccatg	1140
ctcgtctctc	cagcagaggg	ccaggtcaag	ctcaccaaag	ctgtgagtgc	atcttcagt	1200
cccaGcaaca	tccacctagg	agtggccccc	gtggggtcgg	gtcggccct	gaccctgcag	1260
acgatccac	tgaccacggT	gtcgaccaat	gggcctcctg	ccagtactac	tgctcccact	1320

cagctcggttc tccagagtgt tccagcggcc tctactttca aggacacacctt cactttgcag	1380
gcctcttcc ccctgaacgc cagttccaa gacagccagg tggcagcccc aggggctcca	1440
ctgattctca gtggcctccc ccaacttctg gctggggcca accgtccgac caaccggcg	1500
ccacccacgg tcacagggc tggaccagca gggcccagct cttagcccc tgggactgtc	1560
attgtgcct tcatcaggac ttctggcact acagcagccc cttaggtcaa ggagggcca	1620
ctgaggtct cctcttatgt tcagggatg gtgacggggg ccccatgga ggggctgtg	1680
gttctgaag agaccctgag ggagctcctg agagatcagg ctcatttca gccacttcca	1740
acccagggtgg ttccagggg ttcccacaat ccgagccttc tggcaacca gacttgtct	1800
cctcccaccc gccccactgt tgggctgacc ccagtggctg aacttgagct ctctcaggc	1860
tcagggtccc tgctgtatggc tgagctatgt gtgaccacat ctgggagcc tctgacaaga	1920
tcccccaccc cagcccttt ctccccatcc aaccctactt ccctcattaa gatggagccc	1980
catgacatat aa	1992

<210> 13
<211> 1913
<212> DNA
<213> Mus musculus
<223> cDNA c-myb

<400> 13 atggcccgga gaccccgaca cagcatctac agtagcgatg aagatgatga agacatttag atgtgtgacc atgactacga tggcgtgtg cccaaatctg gaaagcgtca cttggggaaa	60
actaggtgga caagggaaaga ggatgagaag ctgaagaagc tggtgaaaca gaacggaaaca	120
gacgactgga aagtcttgc caattatctg cccaaacggga cagatgtgca gtgccaacac	180
cggtggcaga aagtgtgaa ccctgaactc atcaaaggct cctggaccaa agaagaagat	240
cagagagtca tagagttgt ccagaaatat ggtccgaagc gttggctgt tattgccaag	300
cactaaaaag ggagaattgg aaagcagtgt cgggagaggt ggcacaacca tttgaatcca	360
gaagttaaaaaa acaccccttg gacagaagag gaggacagaa tcatttacca ggcacacaaag	420
cgtctggggc acagatgggc agagatcgca aagctgtgc ccggacggac tgataatgt	480
atcaagaacc actggaaattc caccatcggt cgcaagggtgg aacaggaagg ctacctgcag	540
aaggcttcca aagccagcca gacgccagtg gccacgagct tccagaagaa caatcatttg	600
atggggtttgc ggcattgcctc acctccatct cagctcttc caagtggcca gtcctccgtc	660
aacagcgaat atcccttatta ccacatcgcc gaagcacaacca acatctccag tcacgttccc	720
tatcctgtcg cattgcgtgt taatatagtc aacgtccctc agccggctgc ggcagccatc	780
cagagacact ataacgcga agaccctgag aaggaaaagc gaataaagga gctggagttg	840
	900

ctcctgatgt caacagagaa cgagctgaag ggacagcagg cattaccaac acagaaccac	960
acttgcagct accccgggtg gcacagcacc tccattgtgg accagaccag acctcatggg	1020
gatagtgcac ctgtttcctg tttgggagaa caccatgcc a cccatctct gcctgcagat	1080
cccggtcccc tacctgaaga aagtgcctca ccagcaaggt gcatgatcgat ccaccaggc	1140
accattctgg acaatgttaa gaacctctta gaatttgcag aaacactcca gtttatagat	1200
tctttcttga acacttccag caaccatgaa aactcgggt tāgatgcacc taccttaccc	1260
tcacactcctc tcattggtca caaactgaca ccatgtcgag accagactgt gaaaacccag	1320
aaggaaaaatt ccatcttag aactccagct atcaaaaggt caatcctcga aagctctcct	1380
cgaactccca cacoattcaa acatgccctt gcagctcaag aaattaaata cggtcccctg	1440
aagatgctac ctcagacccc ctccatgca gtggaggacc tacaagatgt gattaagcgg	1500
aatcggatg aatctggaat ttttgctgag tttcaagaga gtggaccacc gttactgaāa	1560
aaaatcaagc āggcggtgga gtcgccaact gāgaaatcg gaaacttctt ctgctcāaac	1620
cactggcaā agaacagcct gagcacccaa ctgttctgc aggctctcc tgtggcagat	1680
gccccaaata ttcttacaag ctctgttttta atgacacctg tatcagaaga tgaagacaat	1740
gtcctcaaag ccttaccgt acctaagaac aggcccctgg tgggtccctt gcagccatgc	1800
agtggtgct gggagccagc atcctgtggg aagacagagg accagatgac ggcctccggt	1860
ccggctcggaa aatacgtgaa cgcgttctca gctcgaactc tggcatgtg aga	1913